

마우스 EAE, GVHD 질환에서 CTLA4Ig 융합단백의 면역치료 효과

¹아산생명과학연구소, ²서울아산병원 소아과, ³한양대학교 의과대학 미생물학교실

장성옥¹ · 홍수중² · 조훈식³ · 정용훈³

Immunotherapeutic Effects of CTLA4Ig Fusion Protein on Murine EAE and GVHD

Seong-Ok Jang¹, Soo-Jong Hong², Hoon-Sik Cho³ and Yong-Hoon Chung³

¹Asan Institute for Life Sciences, Seoul, Korea, ²Department of Pediatrics, Asan Medical Center, Ulsan University, ³Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: CTLA4 (CD152), which is expressed on the surface of T cells following activation, has a much higher affinity for B7 molecules comparing to CD28, and is a negative regulator of T cell activation. In contrast to stimulating and agonistic capabilities of monoclonal antibodies specific to CTLA-4, CTLA4Ig fusion protein appears to act as CD28 antagonist and inhibits *in vitro* and *in vivo* T cell priming in variety of immunological conditions. We've set out to confirm whether inhibition of the CD28-B7 costimulatory response using a soluble form of human CTLA4Ig fusion protein would lead to persistent inhibition of alloreactive T cell activation. **Methods:** We have used CHO-dhfr cell-line to produce CTLA4Ig fusion protein. After serum free culture of transfected cell line we purified this recombinant molecule by using protein A column. To confirm characterization of fusion protein, we carried out a series of Western blot, SDS-PAGE and silver staining analyses. We have also investigated the efficacy of CTLA4Ig *in vitro* such as mixed lymphocyte reaction (MLR) & cytotoxic T lymphocyte (CTL) response and *in vivo* such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), graft versus host disease (GVHD) and skin-graft whether this fusion protein could inhibit alloreactive T cell activation and lead to immunosuppression of activated T cell. **Results:** *In vitro* assay, CTLA4Ig fusion protein inhibited immune response in T cell-specific manner: 1) Human CTLA4Ig inhibited allogeneic stimulation in murine MLR; 2) CTLA4Ig prevented the specific killing activity of CTL. *In vivo* assay, human CTLA4Ig revealed the capacities to induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in mouse model: 1) GVHD was efficiently blocked by dose-dependent manner; 2) Clinical score of EAE was significantly decreased compared to normal control; 3) The time of skin-graft rejection was not different between CTLA4Ig treated and control group. **Conclusion:** Human CTLA4Ig suppress the T cell-mediated immune response and efficiently inhibit the EAE, GVHD in mouse model. The mechanism of T cell suppression by human CTLA4Ig fusion protein may be originated from the suppression of activity of cytotoxic T cell. Human CTLA4Ig could not suppress the rejection in mouse skin-graft, this finding suggests that other mechanism except the suppression of cytotoxic T cell may exist on the suppression of graft rejection. (**Immune Network 2003;3(4):302-309**)

Key Words: CTLA4Ig, T cell, anergy, costimulation, MLR, EAE, GVHD, CTL

서 론

T세포의 활성화를 위해서는 크게 2가지의 신호(signal)가 필요한데(1,2), 첫 번째는 T세포의 T세포 수용체(TCR, T cell receptor)-CD3 복합체와 항원제시세포의 구조적적합복합체 간의 상호작용에 의한 신호이며(3), 두 번째 신호는 T세포의 보조자극물질인 CD28과 항원제시세포(APC, antigen presenting cell)의 B7(B7-1 또는 B7-2) 간의 신호가 매우 중요한 역할을 한다(4). 보조자극신호에 관여하는 대표적인 물질인 CD28 항원은 특히 T세포 생산 사이토카인들의 mRNA를 안정화시켜주고, T_H1 사이토카인에 해당되는 interleukin (IL)-2, interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α)(5,6)와 T_H1 및 T_H2 에 공통인 lymphotoxin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 및 IL-3의 생산을 증가시킨다(7). 그러나 보조자극신호인 CD28-B7간의 신호가 정상적으로 작동하지 않으면, T세포는 무반응(anergy)이나 세포사멸에 이르게 된다(8).

이러한 보조자극신호 중 대표적인 예가 immunoglobulin (Ig) superfamily이며, 여기에는 CD2, CD28, ICOS, CTLA-4 등이 속한다(9,10). 또한 활성화된 T세포에는 유도성 항원이 발현하게 되는데, 이러한 T세포 활성화 항원(T cell activation antigen)을 억제함으로써 면역반응을 조절하려는 시도가 있다. 이런 연구에는 활성화항원에 대한 항체 및 T세포 활성화항원에 대한 표면융합단백(Ig fusion protein)을 만들어, 이 항원에 대한 대응체(counterreceptor)의 작용을 방해하여 세포의 무반응을 유도하는 것으로서 이식면역학 분야에 응용을 하거나, 자가면역질환에서 면역억제제로서 기능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(11-13).

보조자극신호를 차단하는 방법으로 CTLA4Ig 융합단백을 이용하여 B7/CD28 보조자극신호를 차단함으로써 T세포 면역반응 억제효과를 유도하는 것이 많이 알려져 있다(14,15). CTLA-4 분자는 CD28과 67%의 DNA homology를 갖으며(16,17), CD28과 동일하게 항원제시세포의 표면에 발현되는 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86)에 결합한다(18). 그러나 CD28이 T세포 표면에 항상 발현이 되는 데 반하여, CTLA-4는 T세포가 활성화되어야만 세포표면으로 발현이 이루어지며, CD28의 발현양에 비해 1/20 이하인 반면에 B7 분자에 대한 결합력이 CD28에 비해 20~200배 이상인 것으로 알려져(8), B7/CD28간의 보조자극신호의 차단을 쉽게 유도한다(19). 따라서 CTLA-4와 면역글로블린(Ig)의 상쇄 영역(constant region)에 해당되는 유전자를 융합하여 제조한 CTLA4Ig 융합단백을 이용하여 상기의 CD28에 의한 보조 자극을 차단함으로써 강력한 T 세

포 면역반응 억제효과가 관찰되었으며(20,21), 항-B7 단일클론항체(anti-B7 monoclonal antibody)를 사용하였을 때보다 더 큰 면역 억제효과를 관찰하였다(22).

최근 연구 결과에 따르면 사람 CTLA4Ig 융합단백을 이용한 마우스 동물실험에서 EAE와 같은 자가면역질환의 치료(11), 다양한 이식 수술에서 거부반응의 억제(12,21), 천식에서의 기도 내 염증반응 억제(23), 류마티즘 및 당뇨병의 치료(13) 등에 있어서 효과가 있으며, 사람을 대상으로 한 임상시험에서는 건선(psoriasis)의 치료(24)에 효과가 있는 것으로 보고되었다. 이러한 결과는 T세포 활성화에 의해 매개되는 질환의 치료에 CTLA4Ig 융합단백의 특이적 면역억제효과를 입증하는 것이다.

본 연구에서는 사람 CTLA4Ig 융합단백을 안정적으로 최대 발현을 이루는 CHO-DHFR 생산세포주를 개발하고, 본 세포주에서 융합단백을 생산하였다. 생산된 사람 CTLA4Ig 융합단백에서 B7 분자와 결합하는 CTLA-4는 마우스의 CTLA-4와 70% 이상의 DNA homology를 갖으며 마우스, 돼지 등 이종의 상대 수용체인 B7.1이나 B7.2에도 특이적 인식이 가능하다. 따라서 이 연구에서는 CTLA4Ig 융합단백이 *in vitro*로서 MLR 반응과 *in vivo*로서 마우스EAE와 GVHD 및 피부 이식 거부반응에서 질환진행에 대한 억제효과와 cytotoxic T 세포 활성화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

사용 세포주 및 플라스미드. 본 실험에 사용된 세포주는 Chinese Hamster Ovary (CHO)-DHFR (ATCC)이었고, 플라스미드(plasmid)는 pCI-neo 벡터(Invitrogen)를 주형으로 pSV2-dhfr 벡터의 DHFR 유전자 부분을 삽입한 pCI-neo-DHFR을 융합단백 발현벡터로 사용하였다. **세포배양.** CHO-DHFR 세포주는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% 우태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS) 함유 Iscove's Modified Eagle Medium (IMDM, Gibco-BRL) 배지에서 배양하였다.

말초혈액 림프구 자극 및 클로닝. CTLA-4와 Immunoglobulin G1 (IgG1) 유전자의 클로닝(cloning)은 성인에서 채취한 혈액에서 말초혈액 단핵구 세포층(peripheral blood mononuclear cell)을 분리한 후 phytohemagglutinin-L (PHA-L, Sigma)을 첨가하여 자극하였다. 자극된 림프구에서 cDNA를 합성 후 각각의 유전자에 대한 PCR 반응을 실시하여 CTLA-4의 경우 456 bp 가량의 PCR 산물이 단일 band로 생성되었으며, IgG1의 경우 702 bp 가량의 PCR 산물이 생성되었다(data not shown). 최종적으로 CTLA4Ig/pCI-neo-DHFR 플라스미드를 제조하였다.

리더 서열의 결정. CTLA-4 분자는 자체의 리더 서열을 그대로 동물 세포주에서 발현 시 세포 외 발현 및 분비가 쉽지 않다는 문제점이 있다. 따라서 본 실험에서는 CTLA-4 유전자를 클로닝한 후 세포 외 단백질 발현이 가장 높은 리더 서열을 선택하였다. 즉 자연 상태의 CTLA-4 분자에서 원하는 유전자만을 PCR하여 N-말단 리더 서열 중 아미노산 6개를 결손시킨 L2 형태의 융합유전자를 구축하였으며, 이 때 결손된 6개의 아미노산은 ACLGFQ이었다. ELISA를 실시하여 발현양을 비교한 결과 이와 같은 구조는 다른 형태(L1, L3, L4, L5)의 리더 서열에 비해 최대 3배 이상의 발현양을 나타내었다(Fig. 1).

유전자 전달감염(Gene transfection) 및 융합단백 발현. 상기와 같이 제조된 플라스미드를 *E. coli*에 형질 전환(transformation)시킨 후 Qiagen kit를 사용하거나 alkali법으로 정제하였다(25). 이를 다시 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 CHO-DHFR⁻ 세포주에 transfection시킨 후 G418 (geneticin, GIBCO-BRL)을 처리하여 플라스미드가 도입된 세포주만을 1차 선별하

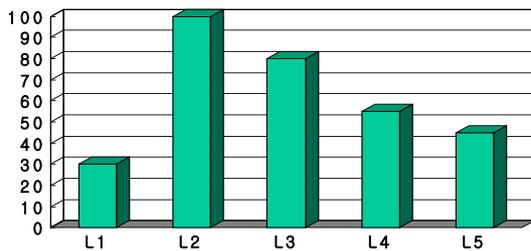


Figure 1. Relative gene expression of fusion protein with variable N-terminal deletion. L2-form revealed the highest expression level of fusion protein, which was measured by ELISA.

였으며, 유전자증폭을 위해 MTX (Methotrexate, GIBCO-BRL)의 농도를 0.002 uM부터 2배씩 증가시키며, 최대 발현양 증폭과정을 거쳐 최종적인 융합단백 생산세포주를 확보하였다.

융합단백 정제 및 전기영동. 제조된 세포주는 37°C, 5% CO₂ 조건의 roller-bottle에서 무혈청배지(CHO-S-SFM II, GIBCO-BRL)를 사용하여 배양하였으며, rProtein A column (Amersham-Pharmacia)과 Amicon UF kit를 이용하여 정제를 실시하였다. 정제된 융합단백의 확인은 SDS-PAGE (26), silver-staining (27), western-blotting (28)을 실시하여, reducing 조건에서는 약 50,000 Da 가량의 band, non-reducing 조건에서는 약 90,000 Da 가량의 band를 확인하였다(Fig. 2). 이 때 사용한 항체는 일차항체로는 마우스 anti-human CTLA-4 항체(KPL)와, 이차항체로 biotin-labeled goat anti-mouse IgG 항체(KPL)를 사용하였다.

MLR (Mixed Lymphocyte Reaction). Responder로는 C57BL/6 (H-2^b) 마우스의 비장세포, stimulant는 Balb/C (H-2^d) 마우스의 비장세포를 각각 사용하였다. Stimulant는 responder와 섞어주기 전에 mitomycin-C (50µg/ml, Sigma)로 37°C에서 30분간 처리하여 불활성화시켰다. Flat-bottom의 96-well plate (Nunc)에 각각 5×10⁵개의 responder 및 stimulant를 넣어 5% CO₂, 37°C incubator에서 72시간 배양함으로써 MLR을 유도하였다. 이 배양에 CTLA4Ig를 최종농도가 100, 10, 1, 0.1, 0.01µg/ml이 되도록 첨가하여 MLR에 대한 효과를 조사하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 1µCi의 ³H-thymidine (Amersham-pharmacia)을 첨가한 뒤 scintillation beta-counter (Wallac)로 측정하여 세포의 증식정도를 counter per minute (cpm)으로 계산하였다.

CTL의 세포독성 억제. 상기의 MLR과 동일한 방법

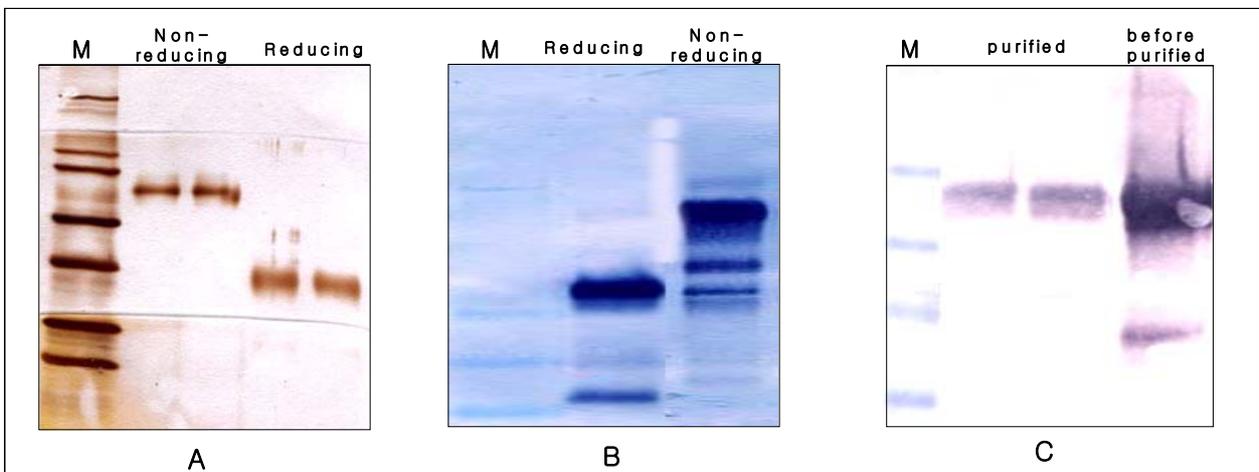


Figure 2. Identification of CTLA4Ig fusion protein (A: Silver staining, B: SDS-PAGE, C: Western-blot analysis, M: Protein marker).

으로 responder cell과 mitomycin-C로 처리한 stimulant cell을 준비하여 bulk MLR을 실시하고 배양이 6일째 되는 날 세포를 모두 회수하여 일 회 세척하고 cell을 count한 뒤 아래의 cytotoxicity assay를 실시하였다. 이때 융합단백의 처리 농도는 3 ug/ml로 고정하였다. 표적세포(P815 H-2^d)의 숫자를 측정하여 총 세포수가 2×10⁷/ml개가 되도록 한다. 표적세포를 1,000 rpm, 실온에서 5분간 원심 분리한 후, kit (Green Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma) 내에 있는 1 ml의 diluent C로 현탁시켰다. 1 ml의 4×10⁶ M의 PKH67를 섞어, 실온에서 5분간 배양한 뒤 2 ml의 FBS를 넣어 1분간 추가 배양한다. 4 ml의 complete media를 넣어 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고, 5% RPMI로 세 번 더 세척한 뒤 최종적으로 5 ml의 complete media에 다시 현탁한 뒤 세포의 viability와 세포수를 측정하였다. 세포-매개성 세포독성(cell-mediated cytotoxicity) 측정을 위해 propidium iodide (10 ug/ml, PI, sigma)을 넣어 죽은 세포를 염색하고 용해정도는 다음과 같은 공식에 의해 산출하였다.

$$\% \text{ specific lysis} = \frac{F-N}{100-N} \times 100$$

(E; effector cell과 함께 배양했을 경우의 target cell 증축은 세포의 비율, N; target cell만 단독으로 배양했을 경우의 target cell의 죽은 세포의 비율)

이식편대 숙주질환(GVHD) 억제. Recipient로는 BDF1 (C57BL/6×DBA2 F1) 마우스를, 그리고 allogenic graft donor는 C57BL/6 마우스를 사용하였다. Syngenic graft donor는 BDF1 마우스를 사용하였다. Allogenic 및 syngenic 마우스의 비장세포를 적출하여 single cell suspension으로 만든 뒤 적혈구를 제거하였다. 이후 GVHD 반응을 보다 확실하게 유도하기 위하여 donor의 비장 세포를 Dynabeads goat anti-mouse IgG (Dyna)로 배양한 후 Magnetic stand (Dyna)에 흡착시키는 방법을 통해 surface IgG 양성 B 세포를 제거하였다. 이후 1.5×10⁷개의 비장세포를 recipient 마우스에 정맥 주사하였다. 융합단백(10, 3.16, 1, 0.316 mg/kg of body weight)은 비장세포 접종 직후와 36시간 경과 후 2회에 걸쳐 복강 내에 투여하였다. Donor 세포의 접종 후 7일째에 recipient 마우스를 죽이고 체중 및 비장의 무게를 측정하여 다음과 같이 spleen index를 산출하였다.

$$\text{Spleen index} = \frac{\text{Allogenic (spleen weight/body weight)}}{\text{Syngenic (spleen weight/body weight)}}$$

실험적 알리지성뇌척수염(EAE) 억제. 마우스는 8주령의 암컷 SJL/J 마우스를 사용하였으며, 한 군에 10마리의 마우스를 공여하였다. Guinea pig의 myelin basic protein (MBP, Sigma)을 생리 식염수에 녹여 complete freund's adjuvant (CFA, Sigma)와 1 : 1로 섞어 마우스의 입과절이 존재하는 4곳에 0.1 ml씩 접종하였다. 이로써 한 마우스당 0.4 mg의 MBP가 접종되며, 접종 즉시 그리고 48시간 후 2회에 걸쳐 200 ng의 pertussis toxin (Gibco-BRL)을 복강 내로 주사하였다. 약물은 0: no abnormality, 1: flaccid tail, 2: hind limb weakness, 3: complete hind limb paralysis, 4: quadriplegia, moribund state, 5: death 등으로 score를 매겨 blind test 방식으로 결과를 도출하였다. 융합단백(3 mg/kg)의 투여는 면역 하루 전부터 시작하여 10일간 계속하였으며, 동물의 관찰은 면역 후 30일까지 계속하였다.

마우스 피부이식 거부반응 억제. 마우스 피부이식의 공여자(donor)는 C57BL/6 마우스를 사용하였으며, 수여자(recipient)는 BALB/c 마우스를 이용하였다. 우선, C57BL/6 마우스를 경추탈골에 의해 치사시킨 뒤 꼬리의 피부를 절개, 채취하여 건조되지 않도록 주의하면서 피부절편(약 0.5 cm×0.5 cm의 크기)을 준비하였다. 이어서 BALB/c 마우스를 xylazine과 ketamine을 적절히 섞어 조제한 마취제로 마취하고 흉부의 측면에 절개창을 만든다. 이곳에 피부절편을 이식하고 일회용 반창고를 이용하여 수술부위를 보호하였다. 융합단백의 투여는 3 mg/kg의 농도로 피부이식한 날부터 시작하여 매일 복강 내로 주사 접종하였다. 일회용 반창고는 이식 수술 후 나흘 뒤 제거하였으며, 이후부터는 피부의 정찰, 괴사여부를 매일 육안으로 관찰하였다.

결 과

MLR 억제효과 검증. MLR을 이용하여 제제 처리에 따른 T 림프구 증식반응의 억제 여부를 확인한 결과, 약물이 첨가되지 않은 대조군실험에서는 cpm값이 52,429±946 (평균값±표준편차, n=3)이었다. 그러나 CTLA4Ig 융합단백을 처리하였을 때는 1 ug/ml 농도에서부터 억제효과를 관찰할 수 있었으며, 100µg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 약 66% (cpm: 17,885±495)의 억제효과를 나타내었다. 이는 CTLA4Ig 융합단백이 농도 의존적으로 T세포 면역반응인 MLR 반응을 억제한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

CTL의 specific killing activity 측정. GVHD 반응과 EAE의 직접적인 작동세포인 CTL의 작용을 융합단백이 억제할 수 있는지 확인하기 위해 CTL의 표적세포에 대한 활성 억제를 측정하였다. 융합단백의 농도를 3µg/ml로 처리하였을 때 E/T ratio가 감소함에 따라

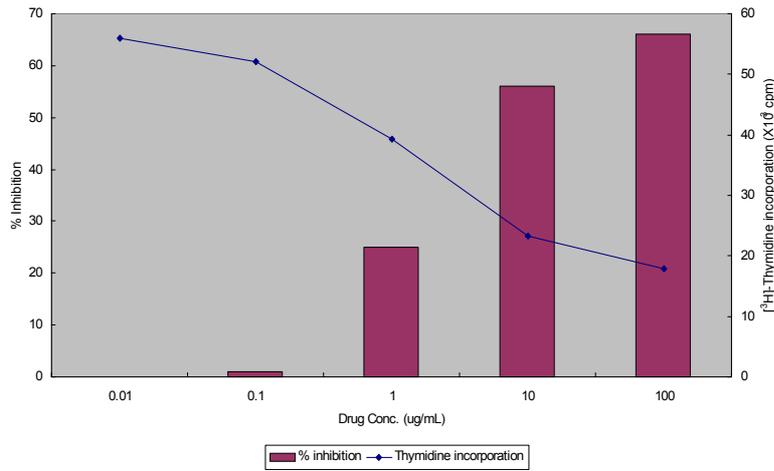


Figure 3. Inhibitory effect of CTLA4Ig on MLR.

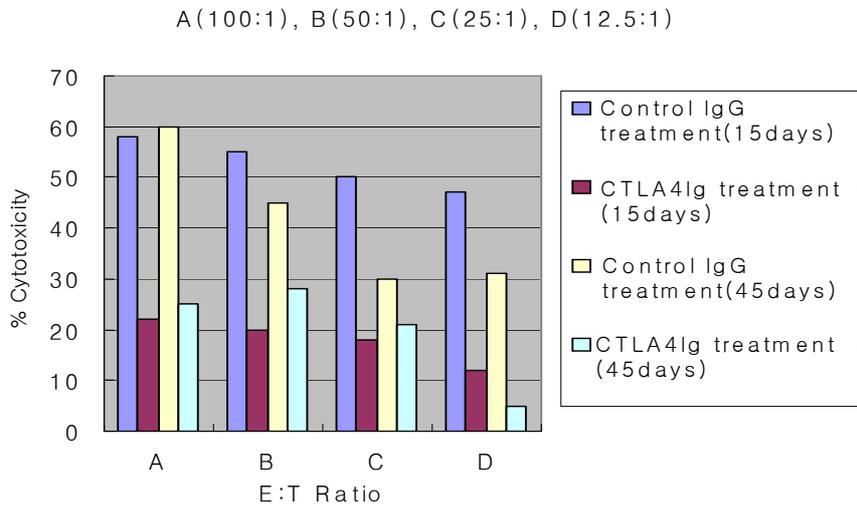


Figure 4. Effect of CTLA4Ig fusion protein on specific killing activity of CTL (E: effector cell, T: target cell).

Table I. Inhibitory effect of CTLA4Ig on GVHD

CTLA4Ig (mg/kg)	Donor	Recipient	Spleen index (mg) /Body weight	Spleen index
0	BDF1	BDF1	3.37±0.05*	-
0	C57BL/6	BDF1	6.77±0.30	2.01
0.316	C57BL/6	BDF1	6.26±0.31	1.86
1	C57BL/6	BDF1	4.74±0.14	1.41 [†]
3.16	C57BL/6	BDF1	3.91±0.07	1.16 [†]
10	C57BL/6	BDF1	3.97±0.16	1.18 [†]

*Data represent mean ± standard deviation (n=5). Groups were compared by t test and p values denoted as [†]p<0.005. The GVHD in BDF1 mice was induced by injecting surface IgG-positive cell-depleted splenocyte (1.5×10⁷) from C57BL/6 mice, when the various doses of CTLA4Ig was administered i.p for 2 times. On 7 day after injection of splenocytes, the GVHD was evaluated by measuring the index of increase in spleen index.

전체적인 세포독성이 감소하였으며, 또한 대조군으로 사용한 control IgG에 의한 작동세포의 anti-hostcytotoxicity에 비해 CTLA4Ig를 처리한 경우에 세포독성이 현저하게 억제되었다. 또한 융합단백 처리 후 45일 후까지도 CTL의 세포독성이 감소되어, 융합단백 처리에 따른 효과가 지속되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). **GVHD에 대한 CTLA4Ig의 억제효과.** Donor를 BDF1의 parent strain인 C57BL/6 마우스의 비장세포를 사용하였는데, GVHD를 일으키는 주 작용세포가 T세포이므로 IgG-양성 B 세포를 제거하여 가능한 한 T세포가 많이 함유되도록 하여 recipient 마우스의 비장종대를 유발할 수 있었다. Donor 혹은 syngenic 마우스의 비장세포를 정맥주사 후 CTLA4Ig을 2회에 걸쳐 투여하여 GVHD 반응에 대한 억제효과가 있는지 확인하였다 (Table I). CTLA4Ig 융합단백을 투여하지 않은 군에서는 spleen index가 2.01으로서 GVHD 반응이 유도되었

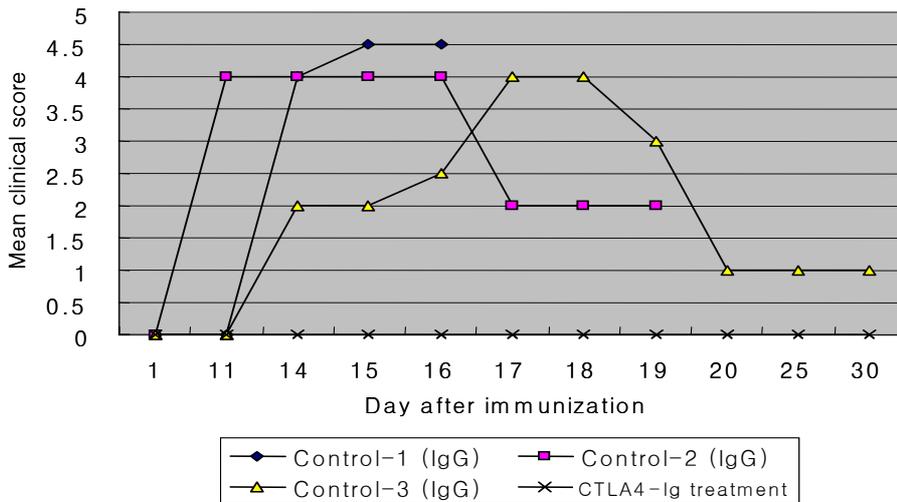


Figure 5. Blocking effect of CTLA4Ig on the induction of EAE in mice.

Table II. Suppressive effect of CTLA4Ig on murine skin-graft rejection

Esperimental groups	Graft survival days (mean±SD)
CTLA4Ig-treated group (n=5)	8.2±0.42
Normal saline-injected control group (n=5)	8.0±0.50

CTLA4Ig did not show significant effects on inhibition of murine skin-allograft rejection.

다. 그러나 CTLA4Ig의 투여 후 GVHD 반응이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 1 mg/kg의 농도에서 spleen index가 1.41로 감소되었고, 3.16 mg/kg의 농도에서는 spleen index가 1.16으로 거의 완벽하게 GVHD 반응을 억제하였으며, 이 농도의 3배인 10 mg/kg의 투여군에서도 1.18로 비슷한 정도로 억제하였다.

EAE 유발에 대한 CTLA4-Ig의 효과. 본 연구에서는 항원으로서 guinea pig 유래의 MBP를 사용하였으며 보다 객관적인 clinical score를 산출하기 위하여 약물을 조제하는 사람과 투여 및 관찰자를 구분하는 blind test를 실시하였다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 약 10일째부터 약물을 처치하지 않은 대조군에서 EAE의 전형적인 증상을 관찰할 수 있었으며 이 증상은 25일 경에 다시 회복되었다. 한편 3 mg/kg의 융합단백을 면역하기 전일부터 시작하여 10일째까지 매일 단회 복강 투여한 그룹에서는 거의 임상 증상이 관찰되지 않았다. **마우스 피부이식 거부반응에 대한 CTLA4Ig의 억제 효과.** 본 융합단백의 처리에 의해 이식 조직편에 대한 거부반응을 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 MHC haplotype이 서로 다른 마우스를 대상으로 skin-allograft를 실시하고 이후 3 mg/kg의 CTLA4Ig 융합단

백을 실험이 종료되는 기간 동안 계속해서 매일 단회, 복강 내 주사하여 비교하였다. C57BL/6 마우스(H-2^b)의 피부를 BALB/c 마우스(H-2^d)에 이식한 경우, 대조군에서는 8±0.5일(평균±표준편차, n=5)에서 모든 조직편이 피사되어 탈락되었다. 한편 동일한 조건하에서 융합단백을 투여한 군은 8.2±0.4 (평균±표준편차, n=5)에서 모든 조직편이 탈락되어, 생리 식염수만을 투여한 군과 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었다(Table II).

이러한 결과는 본 융합단백의 처리에 따라 GVHD 반응은 억제가 가능하지만, 피부이식 거부반응은 억제하지 못함을 의미하고, 그 작용기전이 서로 다르다는 것을 시사한다.

고 찰

최근 연구 결과에 따르면 CTLA4Ig 융합단백은 장기이식에서 거부반응의 억제, 자가면역질환의 치료 등에 있어서 탁월한 효능을 보이는 것으로 보고되고 있다(20-22,24). 이는 기존의 치료 제제가 가지고 있는 한계를 극복하고자 하는 시도로서, 본 연구에서는 이와 같은 융합단백의 활용에 의한 T 세포-매개 면역반응, 특히 CTL (cytotoxic T lymphocyte)의 억제효과를 검증하고자 하였다.

우선 사람 유래의 CTLA-4와 면역글로불린의 상쇄 영역(hinge+CH2+CH3)을 결합시켜 CTLA4Ig 융합단백을 생산 후, *in vitro*와 *in vivo*에서 본 융합단백이 항원-특이적으로 활성화된 T세포-매개의 면역 반응을 억제하는지 여부를 확인하였다.

CTLA-4 분자는 N-말단에 친수성과 소수성의 아미노산으로 37개의 구성된 리더서열(leader sequence)을 가지고 있는데(29), 다른 연구에서는 융합단백의 세포외 발현을 위해 CTLA-4 자체의 리더서열 대신에

oncostatin M나 IL-2의 리더서열을 사용하였다(30,31).

그러나 본 연구에서는 세포 외 발현을 최대화시키는 친수성이 높은 CTLA-4 자체의 리더서열(아미노산 6개를 결손시킨 형태) L2을 결정하였으며, 본 융합단백을 안정적으로 생산하는 CHO-dhfr^r 생산세포주를 개발하였다.

본 융합단백의 효능 확인을 위한 효력시험은 *in vitro* (MLR 유도, CTL의 세포독성 억제)와 *in vivo* (GVHD 억제, EAE model, 마우스 피부이식 거부반응 억제) 시험을 실시하였으며, 마우스 피부이식 억제실험을 제외한 모든 실험에서 본 융합단백은 농도-의존적으로 T세포에 의한 면역반응 억제를 유도하였다.

CTLA4Ig 융합단백이 면역반응에서 T세포에 대한 억제작용을 매개하는지 확인하기 위해 MLR을 실시하였다. MLR은 haplotype이 서로 다른 비장세포를 같이 배양함으로써 임파구 세포를 자극하여 증식정도를 보는 방법으로서 *in vivo*의 GVHD 반응과 매우 유사한 기전에 의한 것으로, 면역억제제의 효과를 관찰하는데 있어서 매우 중요한 실험이다. MLR 유도 실험에서는 haplotype이 다른 alloantigen에 대해 반응하는 T세포를 1 μ g/ml의 낮은 농도에서부터 억제가 유도되었으며, 이는 다른 이식거부반응 억제 연구에서의 반응과 유사한 결과이다(32).

또한 융합단백의 처리에 따라 CTL의 표적 세포에 대한 세포독성이 현저히 억제됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 융합단백에 의해 B7 (B7-1)/CD28 신호의 억제에 의해 CD8⁺ T 세포 활성화와 CTL의 effector 작용 억제가 가능함을 의미한다(33).

GVHD 반응은 주로 세포성 면역, 즉 T 세포-매개에 의해 발생하는 염증성 질환으로서 골수이식 등과 같은 이식면역학 분야에서 매우 중요한 의미를 지닌다. 본 실험에서 융합단백을 1 μ g/ml의 농도에서부터 처리함으로써 효과적인 GVHD 반응에 대한 억제효과를 관찰할 수 있었으며, 약 3.16 mg/kg의 농도에서는 충분한 억제효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

그러나 마우스를 대상으로 실시한 피부이식 실험에서는 본 융합단백의 사용에 의해 거부반응의 억제가 이루어지지 않았는데, 이는 다른 연구 결과(34)와 일치한다. 즉, 피부이식과 같은 이식거부의 억제를 유도하기 위해서는 본 연구결과와 같이 CTL의 활성화에 필수적인 T세포의 CD28/B7 보조자극신호뿐만 아니라 CD40/CD154 등 다른 보조신호들의 복합 억제에 의한 시너지효과가 요구될 수 있음을 시사되었다(35). 이러한 이유 외에도 이 실험에서 사용된 사람 CTLA4Ig의 마우스 B7에 대한 효과가 제한적일 가능성도 배제하기 어렵다.

아직까지 정확한 발병기전이 밝혀지지 않은 사람

의 다발성경화증(MS, multiple sclerosis)의 동물질환모델인 EAE는 주로 SJL/J 마우스나 PL/J 마우스, 혹은 이들의 F1을 이용하여 질환을 유도하며, B세포보다는 T세포 산물이 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(36). 다발성경화증은 척수나 뇌에 존재하는 myelin에 대해 주로 임파구-매개성 염증반응이 유도되어 손상받고 결과적으로 척수를 통한 신경전달에 이상이 유발되어 간헐적인 경련, 사지마비 등이 일어나는 질환이다(37). 그러나 그 발병기전이 완전히 밝혀졌다고 보기는 어려우며 아직도 많은 이론들이 도출되고 있는 실정으로 치료방법에 대해서도 매우 많은 의견들이 제시되고 있다(38,39). 또한 EAE model 실험은 자가면역(autoimmunity)과 면역 무반응(immune tolerance)의 작용기전에 대한 연구에서 가장 많이 이용되는 실험으로서, 본 융합단백의 처리에 의해 임파구-매개성 염증반응이 억제되어 질환의 억제가 유도됨을 관찰하였다. 즉, 앞선 실험에서 가장 효과적인 융합단백의 농도로 판단되는 3 mg/kg의 투여군에서 대조군에 비해 임상적인 증상이 거의 관찰되지 않았으며, 이러한 결과는 보조자극신호 중에서 B7-1 신호를 억제함으로써 가능한 것으로 보인다(40).

이상의 연구결과에서 본 융합단백은 항원-특이적으로 활성화된 T세포의 면역반응 억제를 농도-의존적으로 유도하였으며, 가장 효과적인 제제의 농도는 1~3 μ g/ml이었다. 또한 본 융합단백을 사용한 결과, EAE와 GVHD 반응의 주된 작용 세포인 CD8⁺ cytotoxic T 세포를 억제함으로써 두 질환 모델이 효과적으로 억제가 유도되는 것을 확인하였다.

참 고 문 헌

- Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T: Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol* 48:227-360, 1990
- Page DM, Kane LP, Allison JP, Hedrick SM: Two signals are required for negative selection of CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol* 151:1868-1880, 1993
- Kourilsky P, Claverie JM: MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see? *Adv Immunol* 45:107-193, 1989
- Razi-Wolf Z, Galvin F, Gray G, Reiser H: Evidence for an additional ligand, distinct from B7, for the CTLA-4 receptor. *Proc Natl Acad Sci* 90:11182-11186, 1993
- Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB: Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244:339-343, 1989
- June CH, Ledbetter JA, Gillispie MM, Lindsten T, Thompson CB: T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporin-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7:4472-4481, 1987
- Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH: CD28 activation pathway regulates the production of multiple T cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci* 86:1333-1337, 1989
- Schwartz RH: A cell culture model for T lymphocyte clonal

- energy. *Science* 248;1349-1356, 1990
9. Aruffo A, Seed B: Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci* 84;8573-8577, 1987
 10. Williams AF, Barclay AN: The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6; 381-405, 1988
 11. Peter JP, Carl HJ, Jairo HM, Robert BR, Michael KR: Blockade of CD28 during *in vitro* activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 163;1704-1710, 1999
 12. Neumann UP, Fischer U, Schmitz V, Lang M, Langrehr JM, Neuhaus P: Long-term graft acceptance after rat liver allograft transplantation induced by application of CTLA4-Ig and donor specific spleen cell administration. *Transplant Proc* 34;1400-1401, 2002
 13. Taylor PC: Antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol* 3;323-328, 2003
 14. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Darnle, Ledbetter JA: CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174;561-569, 1991
 15. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, Singh C, Pepper MA: Immunosuppression *in vivo* by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257;792-795, 1992
 16. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P: A new member of the immunoglobulin superfamily, CTLA-4. *Nature* 328;267-270, 1987
 17. Brunet JF, Dosseto M, Denizot F, Mattei MG, Clark WR, Haqqi TM, Ferrier P, Nbholtz M, Schmitt-Verhulst AM, Luciani MF, Golstein P: The inducible cytotoxic T-lymphocyte-associated gene transcript CTLA-1 sequence and gene localization to mouse chromosome 14. *Nature* 322;268-271, 1986
 18. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P: CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147;1037-1044, 1991
 19. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Damle NK: Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 176; 1595-1604, 1992
 20. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS, Bluestone JA: Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 257;789-792, 1992
 21. Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Ito H, Isobe M, Inobe M, Uede T: Induction of immunologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible costimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. *Transplantation* 75; 1374-1379, 2003
 22. Peter JP, Dorothy S, Tiffany AD, Gary SG, Michael JD, Ryo A, Carl HJ, Michael KR: Opposing effects of CTLA4-Ig and anti-CD80 (B7-1) plus anti-CD86 (B7-2) on experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 65;31-39, 1996
 23. Deurloo DT, van Esch BC, Hofstra CL, Nijkamp FP, van Oosterhout AJ: CTLA4-IgG reverses asthma manifestations in a mild but not in a more "severe" ongoing murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25;751-760, 2001
 24. Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Goldfarb MT, Goffe BS, Menter A, Lowe NJ, Krueger G, Brown MJ, Weiner RS, Birkhofer MJ, Warner GL, Berry KK, Linsley PS, Krueger JG, Ochs HD, Kelley SL, Kang S: CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 103;1243-252, 1999
 25. Brun YV, Breton R, Lapointe J: Large scale sequencing projects using rapidly prepared double-stranded plasmid DNA. *DNA Seq* 1;285-289, 1991
 26. Dunbar BS, Liu C, Sammons DW: Identification of the three major proteins of porcine and rabbit zonae pellucidae by high resolution two-dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular, fluid, and ovarian cell proteins. *Biol Reprod* 24; 1111-11124, 1981
 27. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227;680-685, 1970
 28. Burnette WN: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112;195-203, 1981
 29. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS: Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4;535-543, 1996
 30. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS, Bluestone JA: Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 257;789-792, 1992
 31. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, Singh C, Tepper MA: Immunosuppression *in vivo* by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257;792-795, 1992
 32. Zheng XX, Markees TG, Hancock WW, Li Y, Greiner DL, Li XC, Mordes JP, Sayegh MH, Rossini AA, Strom TB: CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J Immunol* 162;4983-4990, 1999
 33. Lang TJ, Nguyen P, Peach R, Gause WC, Via CS: *In vivo* CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function. *J Immunol* 168;3786-3792, 2002
 34. Elwood ET, Larsen CP, Cho HR, Corbascio M, Ritchie SC, Alexander DZ, Tucker-Burden C, Linsley PS, Aruffo A, Hollenbaugh D, Winn KJ, Pearson TC: Prolonged acceptance of concordant and discordant xenografts with combined CD40 and CD28 pathway blockade. *Transplantation* 65;1422-1428, 1998
 35. Shirasugi N, Adams AB, Durham MM, Lukacher AE, Xu H, Rees P, Cowan SR, Williams MA, Pearson TC, Larsen CP: Prevention of chronic rejection in murine cardiac allografts: a comparison of chimerism- and nonchimerism-inducing costimulation blockade-based tolerance induction regimens. *J Immunol* 169;2677-2684, 2002
 36. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinschenker BG: Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343;938-952, 2000
 37. Perrin PJ, Scott D, Davis TA, Gray GS, Doggett MJ, Abe R, June CH, Racke MK: Opposing effects of CTLA4-Ig and anti-CD80 (B7-1) plus anti-CD86 (B7-2) on experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 65;31-39, 1996
 38. Ikushima H, Kanaoka M, Kojima S: Cutting edge: Requirement for growth hormone-releasing hormone in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 171; 2769-2772, 2003
 39. Gommerman JL, Giza K, Perper S, Sizing I, Ngam-Ek A, Nickerson-Nutter C, Browning JL: A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT. *J Clin Invest* 112;755-767, 2003
 40. Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, Ratts RB, Racke MK: Blockade of CD28 during *in vitro* activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 163;1704-1710, 1999